

PROJET FAO / AGLF / TCP / TUN / 6756

**QUALITE D'INOCULUMS POUR LEGUMINEUSES
IMPORTES EN TUNISIE**

**P. BEUNARD
P. SALEZ
H. SAINT MACARY
AVRIL 1989
DRN/Biologie/N° 01**

1. - INTRODUCTION :

La création d'une unité de production d'inoculum pour légumineuses au sein de la Direction de la Production Végétale (D.P.V.) à Tunis est un des objectifs du projet TCP/TUN/6756 mis en oeuvre par la FAO.

Cette unité est destinée à couvrir les besoins en inoculums de haute qualité pour l'extension prévue des légumineuses à graines (haricot, fève, lentilles et éventuellement soja) et fourragères (sainfoin, sulla.. etc). Selon les cultures concernées ces inoculums seront utilisés pour préciser, dans des expérimentations, la réponse à l'inoculation ou, pour les plantes qu'il est nécessaire d'inoculer comme le sulla, pour une distribution auprès des utilisateurs.

La production d'inoculums répondant aux normes de qualité les plus élevées nécessite des compétences et un matériel spécifiques, qui sont en cours d'acquisition dans le cadre du projet.

Dans les expérimentations prévues en 1988, il a paru intéressant de comparer les inoculums préparés au sein de l'unité de production de la D.P.V. avec des produits importés.

Parmi ceux-ci, des inoculums fabriqués au Maroc sont parvenus à Tunis. Il a semblé important de contrôler la qualité de ces produits pour être en mesure d'expliquer d'éventuelles différences d'efficacité avec les produits fabriqués en Tunisie.

Ce rapport présente les méthodes et les résultats de ce contrôle.

2. - METHODES

2.1. Réalisation de suspensions - dilutions

Chaque inoculum a été ouvert en conditions stériles et une partie du sachet versé dans un erlenmeyer contenant un litre d'eau distillée stérile. Les erlenmeyers ont été placés sur un agitateur orbital pendant quinze minutes après lesquelles des suspensions-dilutions ont été réalisées en versant en conditions stériles 1 ml de suspension dans un tube contenant 9 ml d'eau stérile (1).

2.2. Dénombrements de la microflore totale

Les inoculums peuvent contenir d'autres microorganismes que des *Rhizobium*, en particulier si le support sur lequel est adsorbée la culture liquide n'a pas été stérilisé ou si la méthode de conditionnement favorise la contamination par d'autres microorganismes. Dans le cas de cette étude, une estimation de la microflore totale a été faite en réalisant des étalements, en boîtes de Pétri contenant du milieu "extrait de levure-mannitol" (2) gélosé à 1,4 %, des suspensions-dilutions de l'inoculum étudié.

2.3. Détermination du nombre le plus probable de rhizobium

En l'absence de marqueur spécifique des souches de *rhizobium* contenues dans un inoculum, le seul moyen de compter les rhizobium est d'utiliser leur capacité à former des nodosités sur la plante étudiée. Les suspensions-dilutions ont donc été utilisées pour inoculer des plantes poussant en conditions stériles. Des traitements de contrôle sont réalisés avec des plantes inoculées par une souche de spécificité connue d'une part

et des plantes non inoculées d'autre part. Par la suite, la présence de nodosités sur les plantes inoculées avec les suspensions-dilutions est notée. On émet l'hypothèse que la présence d'une nodosité révèle la présence d'au moins un *rhizobium* au départ et en se reportant à des tables statistiques (3), on peut déterminer le nombre initial de *rhizobium* dans l'inoculum.

2.4. Culture de plantes en milieu stérile et inoculation

La culture est réalisée dans des sachets en plastique préstérilisés (whirl-pack, Nasco, 180 ml) remplis de sable siliceux lui-même stérilisé par la chaleur sèche (3 heures à 180° C).

Les semences de légumineuses sont stérilisées par immersion pendant 60 mn dans une solution préparée extemporanément d'hypochlorite de calcium à 7 %. Elles sont ensuite rincées à l'eau stérile et mises à germer dans de la vermiculite humide stérilisée par passage à l'autoclave à 120° C pendant 20 mn.

Après germination les plantules sont transplantées dans les sachets contenant du sable et arrosées avec une solution nutritive stérile ne contenant pas d'azote (annexe 1).

Chaque plante est inoculée le jour même de la transplantation avec 1 ml de la suspension-dilution voulue. Trois répétitions sont effectuées.

3. MATERIELS

3.1. Inoculums

Les inoculums analysés étaient d'apparence semblable. Conditionnés en sac plastique transparent, ils consistent vraisemblablement en une culture de *rhizobium* stabilisée par adsorption sur un support de granulométrie fine noir faisant penser, à l'examen macroscopique, à de la tourbe.

Il s'agissait d'inoculums pour le soja (*Glycine max*) et pour le haricot (*Phaseolus vulgaris*) fabriqués en Septembre 1988 par la SOMEBIO, N° 8 Cité Ibn Sina Agdal, Rabat (Maroc).

Ils ont été prélevés dans un lot en Tunisie en novembre 1988, conservés au frais (4° C) et analysés en février 1989.

3.2. Souches de référence

Les souches utilisées comme contrôle dans les dénombrements par infection sur plantes ont été :

- CIAT 899 pour les inoculums pour haricot (4)
- IRAT FA3 pour les inoculums pour soja (5)

3.3. Matériel végétal

La variété de haricot Marlat, haricot rouge provenant de l'île de la Réunion, a été utilisée pour les inoculums de haricot et pour le soja, la variété IAC 8 fournie par la station de l'IRA Dschang (Cameroun) a été utilisée.

4. RESULTATS

4.1. Suspensions

Les suspensions initiales, nommées "0" dans la suite de ce rapport, ont été réalisés avec des prises d'essai de 255 g pour l'inoculum de haricot et de 253 g pour l'inoculum de soja.

4.2. Etalements en boites de Pétri

Les résultats des dénombrements sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 - Résultats des étalements en boites de Pétri

Inoculum étudié	Dilution d'observation	Type de colonies observé	Nombre de colonies sur les trois boites	Nombre de bactéries par g d'inoculum
Haricot	10^{-7}	1	77 / 78 / 89	$3.2. \times 10^9$
	10^{-8}	1	9 / 14 / 10	
Soja	10^{-7}	1	123 / 110 / 113	4.6×10^9
	10^{-8}	1	17 / 11 / 15	

Dans les dilutions inférieures à celles reportées sur le tableau (10^{-4} à 10^{-6}) il a été noté qu'un seul type de colonies était présent. La morphologie de ces colonies, blanchâtres, muqueuses et leur vitesse de croissance nous a paru compatible avec celle des *rhizobium* à même d'être présents. On peut en conclure que les inoculums étudiés ne contenaient qu'une seule famille de bactéries, et en nombre très élevé puisque leur densité dépasse 10^9 par gramme dans les deux inoculums.

4.3. Dénombrement par infection de plantes

4.3.1. Haricot

- - - -

Les résultats obtenus dans l'essai sont indiqués dans le tableau 2 ci-après.

L'examen des résultats obtenus sur les traitements de contrôle montre que l'essai peut être interprété : les plantes inoculées avec la souche de référence sont abondamment nodulées, ce qui signifie que les conditions de milieu n'ont pas été limitantes pour le phénomène et les plantes non inoculées ne portent pas de nodosités à l'exception d'une sur les cinq. Celles-ci, peu nombreuses, petites et situées à l'extrémité des racines pouvaient facilement s'expliquer par une contamination tardive et être différenciées des nodosités formées précocement, plus nombreuses et situées près du collet chez les autres plantes.

L'utilisation des tables permettant de déduire de ces résultats le nombre de *rhizobium* présents montre qu'il existait, dans la suspension "0" plus de 240×10^5 *rhizobium* spécifiques du haricot.

En tenant compte de la prise d'essai le nombre de *rhizobium* présent dans l'inoculum était donc supérieur à $9,5 \times 10^7$ par gramme.

Tableau 2 - Résultats des dénombrements par infection de haricots

Traitement	Répétition	Nombre de nodosités par plante	Poids de matière sèche des parties aériennes (g / plante)
10 ⁻³	1	46	371
	2	55	352
	3	24	250
			x = 324
10 ⁻⁴	1	41	339
	2	34	342
	3	65	353
			x = 345
10 ⁻⁵	1	46	333
	2	64	393
	3	82	353
			x = 360
10 ⁻⁶	1	34	357
	2	65	322
	3	51	272
			x = 317
10 ⁻⁷	1	58	305
	2	58	360
	3	40	305
			x = 323
CIAT 899	1	83	314
	2	82	334
	3	87	339
	4	117	304
	5	63	314
			x = 321
Témoin non inoculé	1	0	222
	2	15	291
	3	0	240
	4	0	294
	5	0	296
			x = 269

4.3.2. Soja

- - -

Les résultats obtenus dans l'essai sont indiqués dans le tableau 3 ci-après.

Les mêmes conclusions que pour l'essai sur haricot peuvent être tirées de l'examen des résultats obtenus sur les traitements de contrôle.

Le nombre de *rhizobium* présent dans la solution initiale était dans ce cas supérieur à $1\,099 \times 10^5$ par ml, d'où une densité dans l'inoculum supérieure à $4,1 \times 10^9$.

5. DISCUSSION ET CONCLUSION

En rapprochant les résultats obtenus en boîtes de Pétri et sur tests d'infection de plantes, on constate qu'ils ne sont pas incompatibles. Les valeurs obtenues par infection des plantes ne sont que des minima : il aurait fallu effectuer des infections de plantes avec des dilutions plus grandes pour être à même de donner un chiffre de densité précis.

Tableau 3 - Résultats des dénombrements par infection de soja

Traitement	Répétition	Nombre de nodosités par plante	Poids de matière sèche des parties aériennes (mg / plante)
- 3	1	40	341
	2	19	218
	3	15	359
			x = 306
- 4	1	42	369
	2	24	397
	3	16	295
			x = 353
- 5	1	37	319
	2	24	348
	3	26	219
			x = 295
- 6	1	24	356
	2	33	320
	3	35	341
			x = 339
- 7	1	31	298
	2	10	145
	3	42	401
			x = 281
- 8	1	27	373
	2	26	346
	3	26	320
			x = 346
Témoin	1	3	240
	2	0	341
	3	0	243
	4	2	338
	5	12	309
			x = 346
IRAT FA 3	1	10	364
	2	7	167
	3	24	369
	4	12	406
			x = 326

4.3.2. Soja

- - -

Les résultats obtenus dans l'essai sont indiqués dans le tableau 3.

Les mêmes conclusions que pour l'essai sur haricot peuvent être tirées de l'examen des résultats obtenus sur les traitements de contrôle.

Le nombre de *rhizobium* présent dans la solution initiale était dans ce cas supérieur à $1\,099 \times 10^5$ par ml, d'où une densité dans l'inoculum supérieure à $4,1 \times 10^9$.

5. DISCUSSION ET CONCLUSION

En rapprochant les résultats obtenus en boîtes de Pétri et sur tests d'infection de plantes, on constate qu'ils ne sont pas incompatibles. Les valeurs obtenues par infection des plantes ne sont que des minima : il aurait fallu effectuer des infections de plantes avec des dilutions plus grandes pour être à même de donner un chiffre de densité précis.

Cependant, le fait d'avoir observé qu'il n'existait dans les inoculums qu'une seule sorte de bactérie (étalement en boîtes de Pétri) et que cette bactérie ne pouvait être que du *rhizobium* (infections de plantes) peut permettre d'utiliser les résultats des étalements en boîtes de Pétri comme indicateurs absolus du nombre de *rhizobium*. On peut donc conclure que les inoculums pour haricot et pour soja contrôlés dans cet essai contenaient respectivement environ 3×10^9 et 4×10^9 *rhizobium* par gramme de produit, ce qui constitue un excellent résultat. De plus l'absence de contaminants dans ces inoculums permet d'affirmer qu'ils ont été produits dans de bonnes conditions et constitue un gage de bonne conservation.

La seule inconnue demeurant au terme de cette étude est celle de l'efficiencia exacte des souches utilisées dans ces inoculums. Une telle évaluation sortait du champ du simple contrôle de qualité. Les résultats partiels obtenus sur la production de matière sèche des plantes inoculées laisse cependant penser que l'efficiencia de ces souches est comparable à celle de nos souches de référence et peut donc être considérée comme satisfaisante.

BIBLIOGRAPHIE CITEE

- (1) - FAO (1983). Fichier technique de la fixation symbiotique de l'azote Légumineuse/ *Rhizobium* . Rome.
- (2) - VINCENT J.M. (1970). A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Handbook n° 15.
Blackwell Scientific Publication. 164 p.
- (3) - BROCKWELL J. (1980). Experiments with crop and pasture legumes. Principles and practice. In : Methods for evaluating biological nitrogen fixation. Edited by F.J. Bergersen, John Wiley & Sons.
- (4) - CIAT, (1980). Ciat *Rhizobium* Collection, Cali, Colombia, 31 p.
- (5) - SAMSON C., MONTANGE D., BEUNARD P. (1984). Influence du pH du milieu nutritif sur la fixation de l'azote par l'association *Glycine max* - *Rhizobium japonicum* . L'Agronomie Tropicale, 39 : 149-152.

*Office d'Édition de la Recherche Scientifique
et Coopération Internationale*

O.E.R.S.C.I.



**REPROGRAPHIE INDUSTRIELLE
EDITIONS - DUPLICATIONS**

*Parc Modulopolis H 1 Zone Euromédecine
Montpellier 67.52.20.05*